บทที่ 5
การควบคุมการแสดงออกของยีน
(Regulation of Gene Expression)

ยีน (gene) คือส่วนของ DNA ที่มีข้อความทางพันธุกรรมสำหรับสังเคราะห์โปรตีนแต่ละตัว เนื่องจากในเซลล์สิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนอยู่มากมายหลายชนิด และจำนวนของโปรตีนเหล่านั้นก็มากน้อยต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมการแสดงออก (expression) ของยีน ซึ่งก็คือควบคุมการทำงานของยีนในการสร้าง mRNA และโปรตีนแต่ละชนิดนั่นเอง การควบคุมนี้จะทำได้ที่สองระดับคือ ที่ระดับของการสังเคราะห์ RNA (transcriptional level) และที่ระดับของการสังเคราะห์โปรตีน (translational level) แต่การควบคุมที่ระดับทรานสคริปชั่นจะเกิดมากกว่าที่ระดับทรานสเลชั่น เพราะเป็นการประหยัดทั้งพลังงาน และวัสดุที่จะต้องสูญเสียไปในการสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งจะไม่ถูกใช้ต่อไป

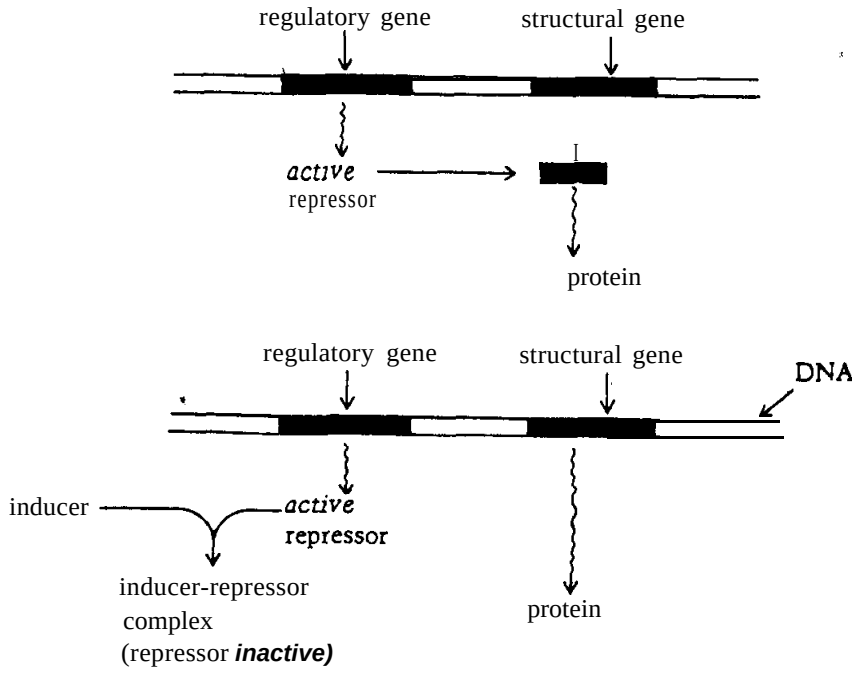
การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชั่นของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

ได้มีผู้ศึกษาถึงกลไกการควบคุมการทำงานของยีนคือ F.Jacob และ J.Monod โดยในปี ค.ศ. 1961 ทั้งสองท่านได้ตั้งทฤษฎีการเหนี่ยวนำและการกดดัน (induction - repression theory) ขึ้น สำหรับทฤษฎีการเหนี่ยวนำนั้น ใช้อธิบายวิธีการที่ E. coli ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (lactose) ให้เป็นกาแลคโตส (galactose) และกลูโคส (glucose) โดยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β - galactosidase) เพื่อใช้เป็นแหล่งให้คาร์บอนและพลังงาน เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสนี้จะถูกสร้างขึ้นมาเฉพาะเมื่อมีแลคโตสอยู่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียเท่านั้น และเมื่อไม่มีแลคโตสแล้วก็จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ขึ้น ดังนั้นจึงเรียกเบต้ากาแลคโตซิเดสว่าเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำ (inducible enzyme) และเรียกแลคโตสว่าตัวเหนี่ยวนำ (inducer)

Jacob และ Monod ยังได้อธิบายถึงการทำงานของยีนโครงสร้าง (structural gene)

ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อความทางพันธุกรรมสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ว่า จะทำงานภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulatory gene, R หรือ i) โดยผ่านทางโปรตีนกดดัน (repressor protein) คือถ้าไม่มีตัวเหนี่ยวนำมาเกี่ยวข้อง โปรตีนกดดันที่ได้จากยีนควบคุมจะมีความว่องไว (active) สามารถไปขัดขวางการสร้างโปรตีนของยีนโครงสร้างได้ (รูปที่ 5 - 1) แต่ถ้าเมื่อไรที่มีตัวเหนี่ยวนำ ตัวเหนี่ยวนำนี้จะไปจับกับโปรตีนกดดัน ทำให้เกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างสารทั้งสองขึ้น ทำให้โปรตีนกดดันหมดความว่องไว และไม่สามารถไปขัดขวางการทำงานของยีนโครงสร้างได้

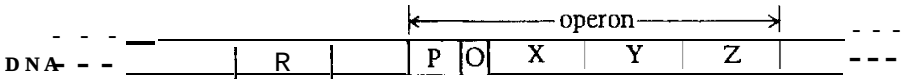
จากการศึกษาต่อมาพบว่า โปรตีนกดดันในสภาวะที่มีความว่องไวนั้น จะทำงานโดยไปจับกับส่วนของ DNA ที่เรียกว่าบริเวณดำเนินการ (operator site, O) แล้วทำให้เอนไซม์ RNA โพลีเมอเรสไม่สามารถจับตัวที่บริเวณส่งเสริม (promoter site, P) ได้ รูปที่ 5-2 แสดงถึงการเรียงลำดับบน DNA ของบริเวณส่งเสริม บริเวณดำเนินการ และยีนโครงสร้าง ซึ่งทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า โอเปอรอน (operon) จะเห็นว่าส่วนทั้งสามในโอเปอรอนจะเรียงลำดับอย่าง



รูปที่ 5 – 1 การควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างโดยโปรตีนกดดัน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนควบคุม

ต่อเนื่องกันไป โดยในแต่ละโอเปอรอนสามารถที่จะมียีนโครงสร้างมากกว่าหนึ่งยีนได้ ส่วนยีน

ควบคุมนั้นจะไม่อยู่ติดกับโอเปอรอนที่จะถูกควบคุม แต่จะอยู่ห่างออกไปอีกที่หนึ่งต่างหากบนสาย DNA นั้น โอเปอรอนประเภทที่มียีนโครงสร้างมากกว่า 1 ยีนนี้ เมื่อเกิดทรานสคริปชั่นจะได้สายของ mRNA ที่มีข้อความทางพันธุกรรมสำหรับโปรตีนหลายชนิด เรียก mRNA แบบนี้ว่า polycistronic mRNA



รูปที่ 5 – 2 รูปแสดงส่วนประกอบของโอเปอรอน

การควบคุมการทำงานของยีนในระดับทรานสคริปชั่นที่จะกล่าวถึงในที่นี้ มี 4 แบบด้วยกัน คือ การควบคุมแบบเนกาทีฟ (negative control) แบบโพซิทีฟ (positive control) แบบ attenuation และแบบเข้มงวด (stringent control)

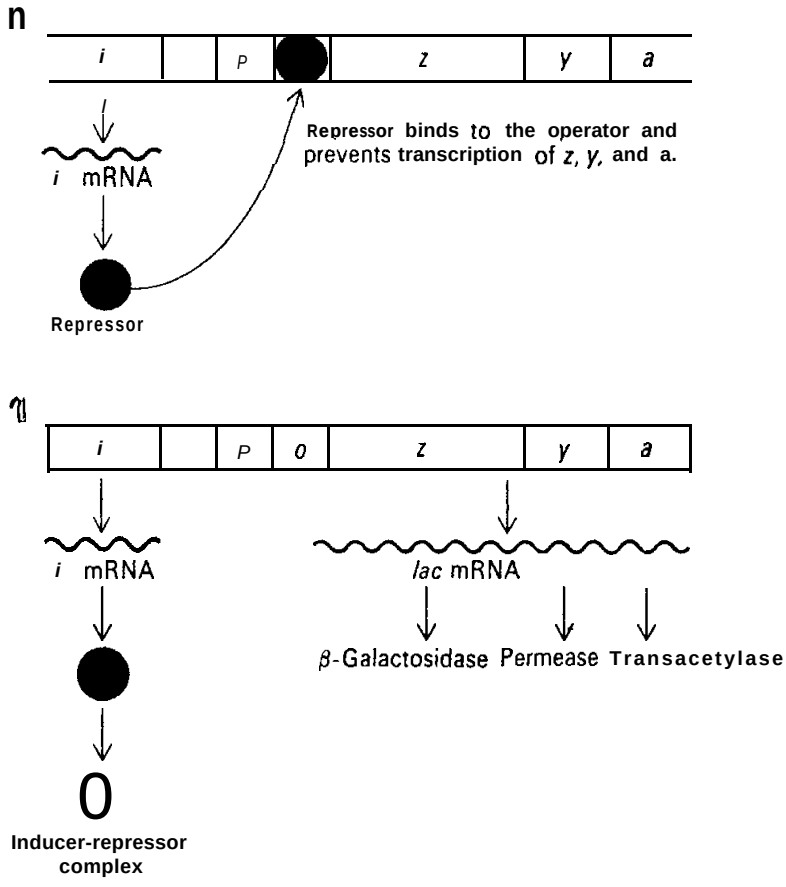
การควบคุมแบบเนกาทีฟ

การควบคุมแบบนี้คือ ถ้ามีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณดำเนินการ จะทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดไม่ได้ ตัวอย่างของการควบคุมแบบเนกาทีฟ ได้แก่

1. **การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์** (enzyme induction) ตัวอย่างที่จะยกในกรณีนี้ได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ 3 ตัวที่จะใช้ในการย่อยสลายและนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ประโยชน์ ซึ่งได้แก่เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายแลคโตสให้กลายเป็นกาแลคโตสและกลูโคส เอนไซม์กาแลคโตไซด์เพอมีเอส (galactoside permease) ทำหน้าที่ควบคุมอัตราเร็วของการขนส่งแลคโตสเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ตัวสุดท้ายคือ กาแลคโต-ไซด์อเซทิลเลส (galactoside acetylase) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่

ปกติ E. coli จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานโดยไม่ต้องอาศัยแลคโตสด้วย ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสามที่กล่าวข้างต้นนั้นก็จะถูกสร้างขึ้นในเซลล์น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่ถ้าเปลี่ยนน้ำเลี้ยง

แบคทีเรียนี้เสียใหม่ ให้มีแต่แลคโตสเท่านั้นที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในภาวะเช่นนี้จะเกิดการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิดนั้นขึ้นมา เพื่อใช้ย่อยแลคโตสเป็นกาแลคโตสและกลูโคส แล้วแบคทีเรียจะได้นำกลูโคสไปใช้เป็นพลังงานได้ต่อไป ปรากฏการณ์ที่ตัวเหนี่ยวนำเพียงตัวเดียวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดนี้ เรียกว่าการเหนี่ยวนำร่วม (coordinate induction) กลไกการทำงานของแลคโตสโอเปอรอน (รูปที่ 5 - 3) อธิบายได้ดังนี้คือ



รูปที่ 5 – 3 รูปแสดงส่วนประกอบของแลคโตสโอเปอรอน และแสดงการทำงานของโอเปอรอนเมื่อไม่มีตัวเหนี่ยวนำ (ก) กับเมื่อมีตัวเหนี่ยวนำ (ข)

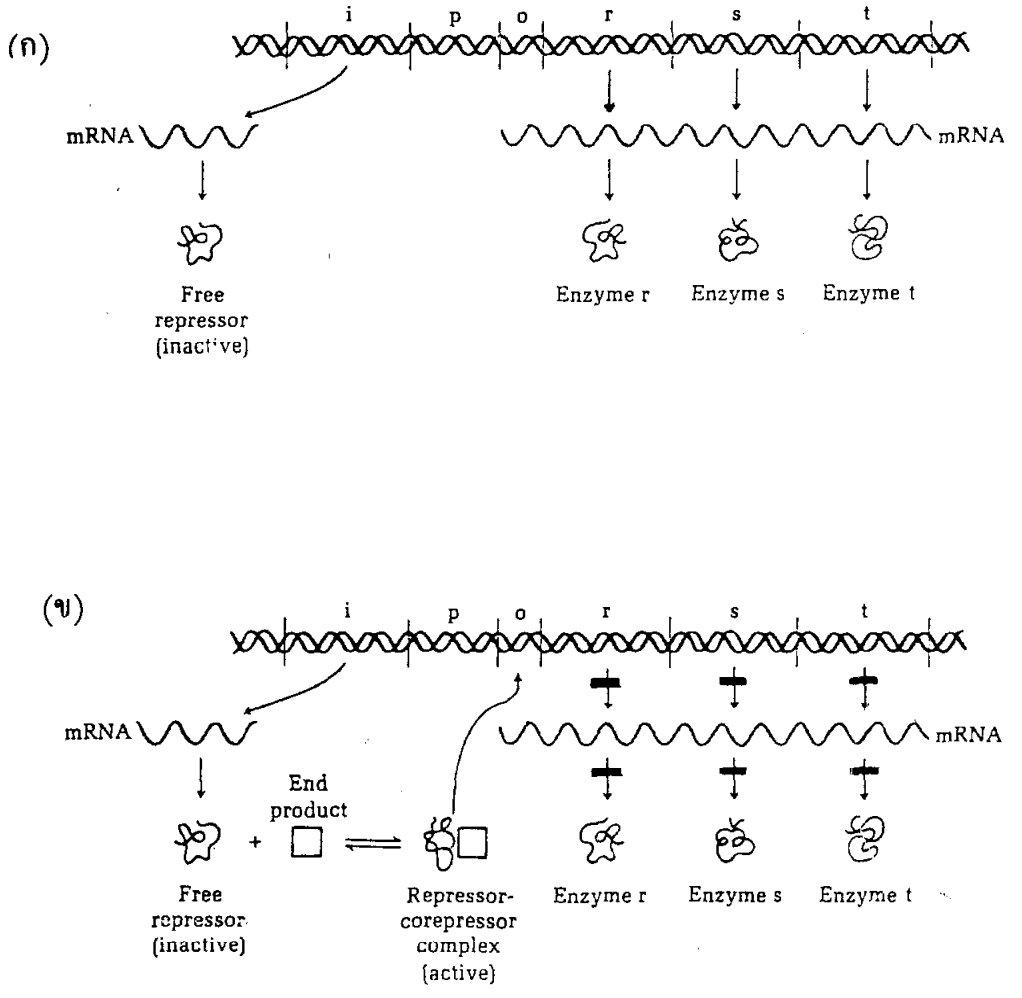
เมื่อไม่มีแลคโตส ยีนควบคุมจะสร้างโปรตีนกดดันซึ่งมีความว่องไว สามารถไปจับที่บริเวณดำเนินการได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้าง z, y, a เกิดไม่ได้ ก็จะไม่มีการสร้างเอนไซม์เกิดขึ้น แต่ถ้ามีตัวเหนี่ยวนำคือแลคโตส แลคโตสจะจับตัวกับโปรตีนกดดัน ได้คอมเพล็กซ์ซึ่งหมดความว่องไว จึงไปจับตัวที่บริเวณดำเนินการไม่ได้ ดังนั้นทรานสคริปชั่นจะเกิดขึ้นได้ และทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิดนั้นขึ้นด้วย

การจับตัวกันระหว่างโปรตีนกดดันและตัวเหนี่ยวนำนั้น เป็นชนิดที่สามารถผันกลับได้ คือ เมื่อเอนไซม์ได้ย่อยแลคโตสจนหมดลงแล้ว จำนวนของเอนไซม์เหล่านั้นก็จะลดลงทันที

ถ้ายีนควบคุมเกิดผิดปกติ ไม่สามารถสร้างโปรตีนกดดันได้ ก็จะไม่มีตัวขัดขวางบริเวณดำเนินการ ทำให้ RNA โพลีเมอเรสสร้าง mRNA ได้ตลอดเวลาไม่ว่าจะมีตัวเหนี่ยวนำอยู่หรือไม่ ดังนั้น เอนไซม์เหนี่ยวนำก็จะกลับมีอยู่ตลอดเวลาภายในเซลล์ด้วยปริมาณที่คงที่ ทำให้กลายเป็นเอนไซม์ประจำ (constitutive enzyme) ไป

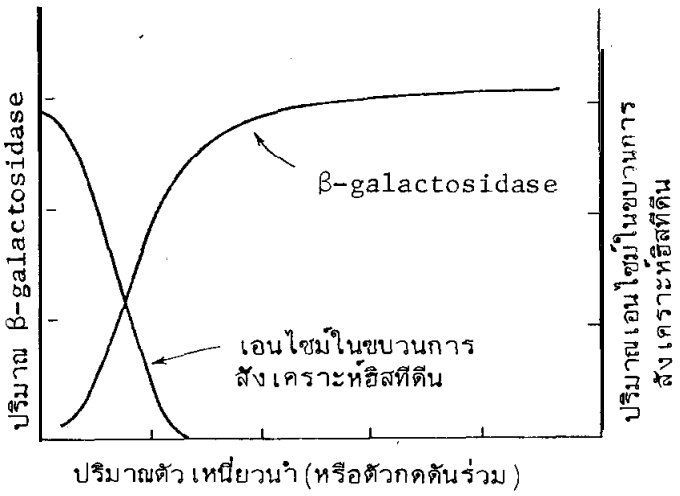
2. ***การกดดันการสร้างเอนไซม์*** (enzyme repression) *กรณีนี้พบในฮิสทีดีนโอเปอรอน* ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีน ถ้าให้ฮีสทีดีนลงในน้ำเลี้ยง E. coli แล้ว E. coli จะเอาฮิสทีดีนนี้ไปใช้โดยตรงเลย จึงไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์ทั้งหมดในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีนขึ้น การกดดันการสร้างเอนไซม์ประเภทนี้เรียกว่าการกดดันร่วม (coordinate repression)

กลไกการทำงานของฮิสทีดีนโอเปอรอน (รูปที่ 5 - 4) คือ เมื่อไม่มีฮิสทีดีน ยีนควบคุมจะสร้างโปรตีนกดดันซึ่งไม่ว่องไว ดังนั้นจึงไปจับตัวที่บริเวณดำเนินการไม่ได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นเกิดขึ้นได้ และเอนไซม์ก็จะถูกสังเคราะห์ขึ้น แต่ถ้ามีฮิสทีดีนหรือเรียกว่าตัวร่วมกดดัน (corepressor) อยู่ด้วยแล้ว ฮิสทีดีนจะไปจับตัวกับโปรตีนกดดัน ได้คอมเพล็กซ์ที่มีความว่องไวเกิดขึ้น สามารถไปจับที่บริเวณดำเนินการได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นหยุดลง และไม่เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้น



รูปที่ 5 – 4 กลไกการทำงานของฮิสทีดีนโอเปอรอนเมื่อไม่มีตัวร่วมกดดัน (ก) และเมื่อมีตัวร่วมกดดัน (ข)

จากตัวอย่างทั้งสองของการควบคุมแบบเนกาทีฟที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอยู่ในเรื่องของจำนวนเอนไซม์ในเซลล์ เมื่อดูเปรียบเทียบกับจำนวนตัวเหนี่ยวนำ (หรือตัวร่วมกดดัน) ที่ให้ลงไปในน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย (รูปที่ 5 - 5) กล่าวคือ ในกรณีของเอนไซม์เบต้ากา



รูปที่ 5 – 5 ความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของตัวเหนี่ยวนำ (หรือตัวร่วมกดดัน) ที่ให้กับแบคทีเรีย

แลคโตซิเดสนั้น ถ้ายิ่งมีตัวเหนี่ยวนำคือแลคโตสอยู่มาก ปริมาณของเอนไซม์ก็จะยิ่งมีมากขึ้นตามไปด้วย แต่ถ้าเป็นในกรณีของฮิสทีดีน ถ้ามีฮิสทีดีนอยู่มาก ปริมาณของเอนไซม์ในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีนจะถูกกดดันให้มีการสร้างน้อยลง

การควบคุมแบบโพซิทีฟ

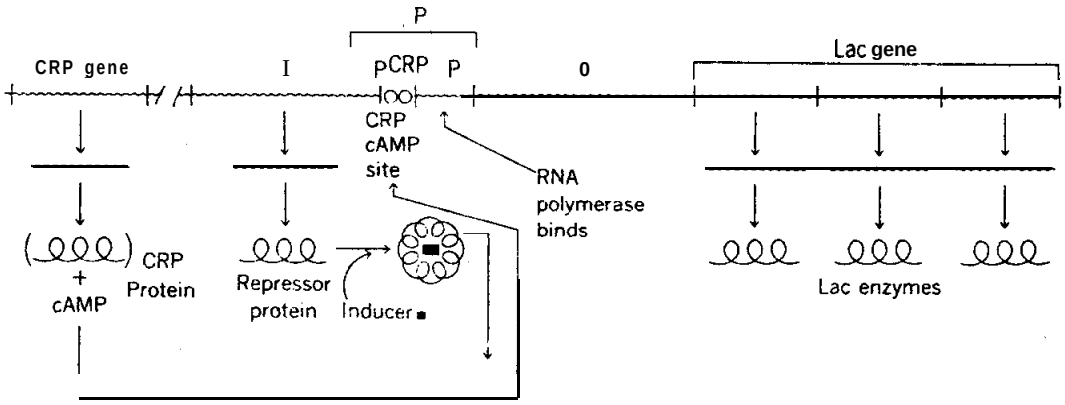
การควบคุมแบบนี้คือ ถ้ามีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณส่งเสริม (มิใช่ที่บริเวณดำเนินการเหมือนในกรณีการควบคุมแบบเนกาทีฟ) จะทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดได้มากขึ้น ตัวอย่างของการควบคุมแบบโพซิทีฟนี้ พบในการกดดันการสร้างเอนไซม์อีกแบบหนึ่งของแบคทีเรียคือ catabolite repression

ตัวกดดันในกรณีนี้คือกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งพลังงานโดยตรงของเซลล์ เมื่อมีกลูโคสอยู่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียแล้ว ไม่ว่าจะมีแลคโตสหรือน้ำตาลตัวอื่น ๆ อยู่ด้วยก็ตาม กลูโคสจะไปกดดัน

ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำขึ้นมาเพื่อใช้น้ำตาลเหล่านั้นเป็นแหล่งพลังงานได้เลย นอกจากนี้แล้วกลูโคสยังสามารถกดดันการสร้างเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการหายใจและขบวนการขนส่งอีเลคตรอนได้ด้วย ซึ่งแต่เดิมนั้นเข้าใจกันว่าเอนไซม์ในขบวนการเหล่านี้เป็นเอนไซม์ประจำ เมื่อเป็นเช่นนี้ก็ทำให้แบคทีเรียต้องหันกลับไปใช้วิถีที่เก่าแก่ที่สุดในการสลายสารเพื่อให้ได้พลังงาน คือวิถีกลัยโคไลซิส การที่กลูโคสหรืออนุพันธ์ที่ได้จากกลูโคสสามารถกดดันการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำและเอนไซม์ประจำในขบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ได้นั้น เรียกการกดดันชนิดนี้ว่า catabolite repression

กลไกของ catabolite repression (รูปที่ 5 - 6) อธิบายได้โดยแลคโตสโอเปอรอนเช่นกัน แต่การควบคุมแบบนี้จะเกิดที่บริเวณส่งเสริม ซึ่งเป็นที่ ๆ RNA โพลีเมอเรสมาจับตัวเพื่อเริ่มต้นทรานสคริปชั่น ในบริเวณส่งเสริมนี้ยังมีสถานที่ ๆ จะทำให้คอมเพล็กซ์ตัวหนึ่งมาจับด้วย นั่นคือ cyclic AMP (cAMP) – cyclic AMP receptor protein (CRP) คอมเพล็กซ์ จากการทดลองพบว่าทั้ง cAMP และ CRP เป็นสารที่ช่วยในการเริ่มต้นสังเคราะห์ RNA โดยจะช่วยให้ RNA โพลีเมอเรสสามารถหาจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่นซึ่งอยู่ในบริเวณส่งเสริมได้ โดย cAMP จะต้องรวมตัวกับ CRP ให้ได้เป็นคอมเพล็กซ์เกิดขึ้นก่อน แล้วจึงจะเข้าไปจับตัวที่บริเวณส่งเสริม

ถ้ามีกลูโคสอยู่ในเซลล์อย่างเพียงพอแล้ว cAMP จะมีปริมาณน้อย และ CRP ก็จะหมดความว่องไว ทำให้ไม่เกิดคอมเพล็กซ์ที่จะไปจับที่บริเวณส่งเสริมได้ ดังนั้นการจับตัว



รูปที่ 5 – 6 กลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด catabolite repression ในกรณีที่ปริมาณกลูโคสในเซลล์แบคทีเรียลดน้อยลง

ของ RNA โพลีเมอเรสเพื่อเริ่มทรานสคริปชั่นก็จะลดน้อยลงอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่

ให้เกิดการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำที่จะใช้แหล่งพลังงานอื่น แต่ถ้าระดับกลูโคสในเซลล์ลดลง และมีแหล่งพลังงานอื่นที่เซลล์จะใช้ได้เช่นแลคโตส cAMP จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น แล้วไปรวมตัวกับ CRP ได้เป็น cAMP – CRP คอมเพล็กซ์ ซึ่งจะเข้าไปจับตัวที่บริเวณส่งเสริม แล้วช่วยให้ RNA โพลีเมอเรสหาจุดเริ่มต้นในบริเวณส่งเสริมนี้ได้ดีขึ้น ทำให้เกิดการสังเคราะห์ RNA และเอนไซม์ของยีนโครงสร้างขึ้นได้

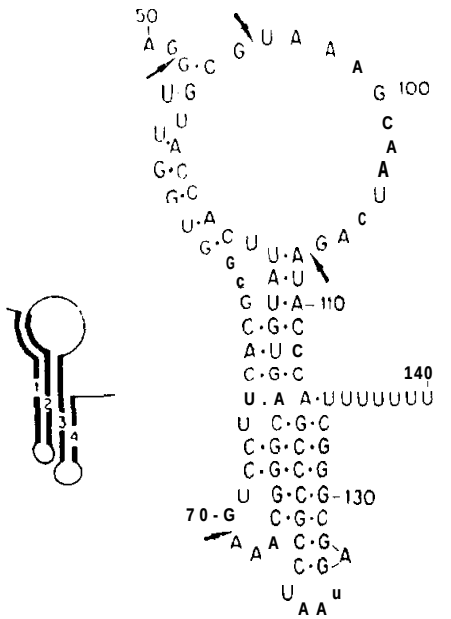
การควบคุมแบบ attenuation

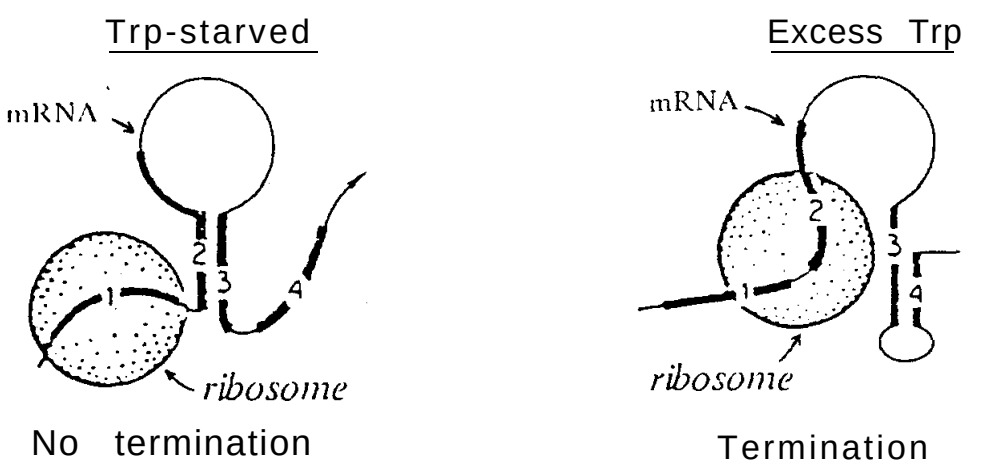
การควบคุมแบบนี้ เกิดจาก leader sequence ซึ่งคือลำดับของเบสที่เรียงกันอยู่ทางปลาย 5′ ของ mRNA ก่อนหน้าที่จะถึงเบสตัวแรกที่ถอดรหัสมาจากยีนโครงสร้าง leader sequence จะมีความยาวแตกต่างกันไปในแต่ละ mRNA เช่น ถ้าเป็น E.coli leader sequence ของ mRNA จาก gal operon จะมี 26 เบส ในขณะที่ mRNA จาก trp operon มี 140 เบส หน้าที่หนึ่งของ leader sequence ก็คือ เป็นสถานที่ให้ไรโบโซมมาจับตัว โดยบริเวณที่เกิดการจับตัวก็คือ Shine-Dalgarno sequence นอกจากนี้แล้วยังพบว่า leader sequence ส่วนมากในโปรคาริโอท จะมีส่วนช่วยควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ระดับทรานสคริปชั่นด้วย การควบคุมชนิดนี้ทำให้การเริ่มต้นทรานสคริปชั่นเกิดภายใน leader sequence แล้วหยุดลงก่อนหน้าที่จะเกิดทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างของโอเปอรอนต่อไป

การควบคุมแบบ attenuation พบในโอเปอรอนหลายชนิดของ E.coli ที่มียีนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอมิโน เช่น ฮิสทีดีน, ลิวซีน และทริปโทเฟนโอเปอรอน Charles Yanofsky และผู้ร่วมงานได้ศึกษาการควบคุมแบบนี้ โดยใช้ trp operon ของ E.coli โอเปอรอนนี้มียีนโครงสร้าง 5 ยีนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการผลิตทริปโทเฟนของแบคทีเรีย เขาได้เสนอสมมติฐานขึ้นมาเพื่อใช้อธิบายรายละเอียดในระดับโมเลกุล โดยหลักใหญ่ของสมมติฐานนี้อยู่ที่ว่า ในแบคทีเรียซึ่งไม่มีนิวเคลียสนั้น ทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นจะเกิดไปพร้อม ๆ กัน กล่าวคือ ในขณะที่ RNA โพลีเมอเรสกำลังผลิต mRNA (คือเกิดทรานสคริปชั่น) อยู่นั้น ไรโบโซมก็จะเข้ามาเกาะที่ mRNA ใหม่นี้ เพื่อเกิดการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ (คือเกิดทรานสเลชั่น) ไปด้วย ในสมมติฐาน attenuation การเริ่มต้นทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นจะอยู่ที่บริเวณ leader sequence ซึ่งมีรหัสสำหรับการสร้าง leader peptide สำหรับกรณีของทริปโทเฟนโอเปอรอน leader peptide จะมีกรดอมิโน 14 ตัว โดยที่ 2 ตัวในจำนวนนี้จะเป็นทริปโทเฟนซึ่งเรียงอยู่ติดกัน สภาพการณ์เช่นนี้นับว่าแปลกสำหรับเปปไทด์สายสั้น ๆ

ทั้งนี้เพราะทริปโทเฟนเป็นกรดอมิโนชนิดที่พบน้อยในโปรตีนของ E.coli ทริปโทเฟนทั้ง 2 ตัวที่ถูกเติมเข้าไปในขบวนการทรานสเลชั่นนี้ จะไปมีผลทำให้ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟน-โอเปอรอนเกิดได้ดีขึ้นหรือลดลงตามรูปที่ 5-7

ภายในสาย mRNA ระหว่างรหัสหยุดสำหรับ leader peptide กับจุดเริ่มต้นของยีนโครงสร้างยีนแรกคือ trp E นั้น เรียกว่า attenuator บริเวณนี้สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ





รูปที่ 5-7 (บน) โครงสร้างบริเวณ 1, 2, 3, และ 4 ของ attenuator

(ล่าง) แผนผังแสดงการควบคุมแบบ attenuation ของทริปโทเฟน โอเปอรอนของ E.coli

ที่ควบคุมขบวนการทรานสคริปชั่นได้ โดยโครงสร้างเหล่านี้เกิดจากการทำพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่เข้าคู่กันภายในสาย mRNA ซึ่งบริเวณที่เกิดปฏิกริยานี้ได้จะเรียกว่าบริเวณ 1, 2, 3 และ 4 โครงสร้างทุติยภูมิที่เป็นผลมาจากทรานสเลชั่นบริเวณ leader sequence จะเป็นตัวบอกว่า ทรานสคริปชั่นควรจะสิ้นสุดลงที่ปลาย leader sequence หรือดำเนินต่อไปจนถึงยีนโครงสร้างของโอเปอรอน โดยตัวควบคุมที่เกี่ยวข้องได้แก่ระดับภายในเซลล์ของทริปโทเฟน อันเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถี

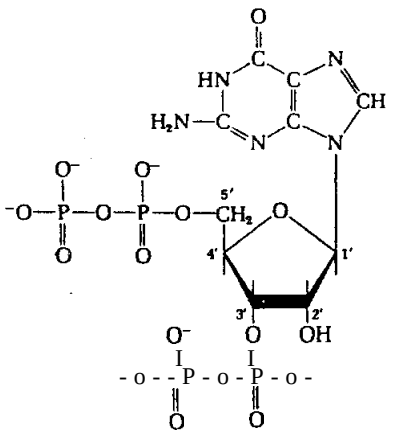
เมื่อระดับทริปโทเฟนภายในเซลล์ลดต่ำลง trp-tRNA สำหรับใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนก็จะมีจำนวนจำกัด ทำให้การแปลรหัสของ leader sequence ช้าลงเมื่อไรโบโซมมาถึงรหัสทั้งสองของทริปโทเฟน (UGG UGG) บน mRNA การหยุดชงักของไรโบโซมนี้ จะเป็นสัญญาณในการควบคุม คือทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิระหว่างบริเวณ 2 และ 3 ขึ้น เพราะเมื่อขบวนการทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นที่เกิดพร้อม ๆ กันมาถึงบริเวณนี้ ทรานสคริปชั่นจะดำเนินต่อไปได้ ในขณะที่ทรานสเลชั่นจะหยุดชงักลงชั่วขณะเนื่องจากขาด trp-tRNA ทำให้บริเวณ 1 ซึ่งอยู่ใกล้รหัส UGG ของทริปโทเฟนถูกไรโบโซมบดบังจนไม่สามารถที่จะทำพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณ 2 ที่เข้าคู่กันได้ บริเวณ 2 จึงต้องไปเข้าคู่กับบริเวณ 3 เกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิแบบ 2-3 ขึ้น ซึ่งโครงสร้างแบบนี้จะทำให้ RNA โพลีเมอเรสเกิดทรานสคริปชั่นต่อไปจนตลอดโอเปอรอน ดังนั้นจะเห็นว่า เมื่อทริปโทเฟนภายในเซลล์มีระดับต่ำจะไปช่วยกระตุ้นให้ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟนโอเปอรอนเกิดได้มากขึ้น ซึ่งผลสุดท้ายก็คือ จะทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์ทริปโทเฟนเพิ่มขึ้น

ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีทริปโทเฟนภายในเซลล์อย่างเพียงพอ จะไม่มีการหยุดชงักของไรโบโซมที่รหัส UGG เพราะ trp-tRNA มีจำนวนมาก ดังนั้น ขบวนการทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นก็จะเกิดไล่ ๆ กันไป ทำให้บริเวณ 1 และ 2 ไม่ว่างพอที่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนเนื่องจากถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในขบวนการทรานสเลชั่น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ RNA โพลีเมอเรสสร้างบริเวณที่ 3 และ 4 ขึ้นแล้ว บริเวณทั้งสองนี้จะเกิดการจับคู่กันได้ ทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ 3-4 ซึ่งโครงสร้างแบบนี้จะเป็นสัญญาณหยุดสำหรับ RNA โพลีเมอเรส ทำให้การสังเคราะห์ mRNA สิ้นสุดลงที่ปลาย leader sequence ดังนั้น ยีนโครงสร้างทั้งหลายในทริปโทเฟนโอเปอรอนก็จะไม่ถูกถอดรหัส ในกรณีนี้จะเห็นว่า เมื่อมีทริปโทเฟนภายในเซลล์อยู่เพียงพอแล้ว ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟนโอเปอรอนจะลดลง

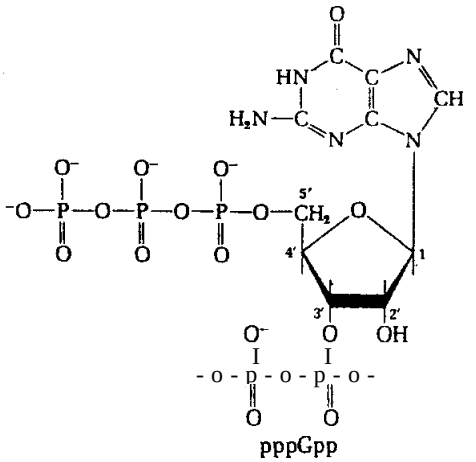
จากที่กล่าวมานี้จะเห็นว่า สมมติฐาน attenuation เป็นระบบการควบคุมที่ซับซ้อน มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างทรานสคริปชั่นกับทรานสเลชั่น มีรหัสบน leader sequence ที่ส่งผลกับอัตราเร็วของทรานสเลชั่น และมีการเกิดรูปแบบของโครงสร้างทุติยภูมิที่เหมาะสม เพื่อใช้ให้ถูกต้องตามเป้าหมายที่ต้องการ ประเด็นที่เป็นหัวใจของ attenuation ก็คือ การที่บางบริเวณบน attenuator สามารถจับคู่กับบริเวณที่อยู่ก่อนหน้า หรือบริเวณที่อยู่ตามหลังได้ สำหรับกรดอมิโนที่เกิดจากรหัสใน leader sequence ที่จะเป็นตัวทำให้ทรานสเลชั่นหยุดชะงักนั้น จะแตกต่างกันไปในระบบ attenuation ของโอเปอรอนอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าเป็น his operon บน leader peptide จะมีฮิสทีดีน 7 ตัวเรียงต่อกัน ส่วนใน leu operon บน leader peptide จะมีลิวซีน 4 ตัวเรียงต่อกัน นั่นก็คือโอเปอรอนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอมิโนตัวใด กรดอมิโนตัวนั้นจะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนระดับทรานสคริปชั่น

การควบคุมแบบเข้มงวด

การควบคุมทั้ง 3 แบบที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่าเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA มีการควบคุมในระดับทรานสคริปชั่นอีกแบบหนึ่งที่เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ rRNA เรียกว่า stringent control ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของแบคทีเรียขาดกรดอมิโนที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน การควบคุมชนิดนี้เป็นการประหยัดพลังงาน กล่าวคือ แบคทีเรียจะไม่สร้างไรโบโซม (ซึ่งประกอบด้วย rRNA) ขึ้นมา เนื่องจากถ้าสร้างขึ้นมาแล้ว ไรโบโซมนั้นก็จะไม่ได้ถูกนำไปใช้ต่อ เพราะไม่มีกรดอมิโนที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ในสภาวะของการขาดกรดอมิโนนี้ พบว่าเซลล์จะสร้างนิวคลีโอไทด์พิเศษขึ้นมาสองตัวคือ กัวโนซีน 5′-ไดฟอสเฟท 2′(3′) - ไดฟอสเฟท (ppGpp) และ กัวโนซีน 5′ - ไทรฟอสเฟท 2′(3′) - ไดฟอสเฟท (pppGpp) ซึ่งจะทำหน้าที่ขัดขวางการสังเคราะห์ rRNA แต่กลไกการทำงานของนิวคลีโอไทด์สองตัวนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด



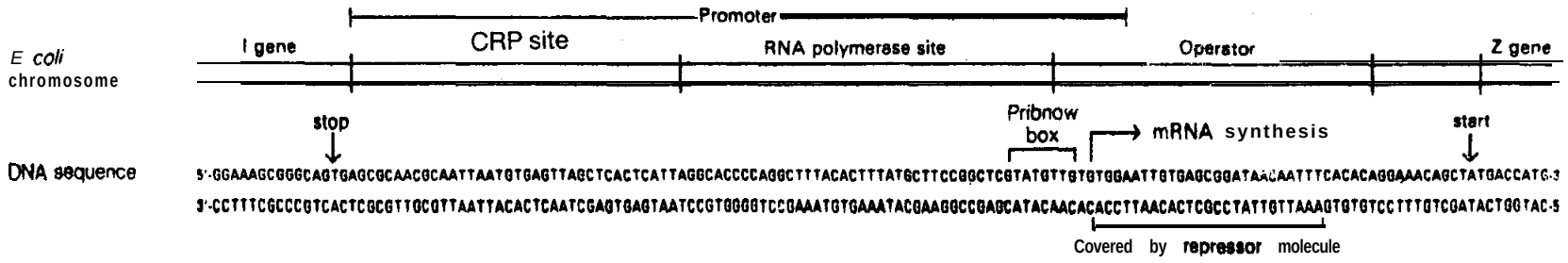
ppGpp
Guanosine 5′-diphosphate 2′(3′)-diphosphate
(also called guanosine tetraphosphate)



pppGpp
Guanosine 5′-triphosphate 2′(3′)-diphosphate

การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณส่งเสริมและบริเวณดำเนินการ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาโดยใช้ lac operon ทำให้ทราบว่าส่วนของบริเวณส่งเสริมและบริเวณดำเนินการนั้นคาบเกี่ยว (overlap) กันอยู่ ตามรูปที่ 5-8 ทั้งนี้เพราะสถานที่เริ่มต้นขบวนการทรานสคริปชั่นภายในบริเวณดำเนินการนั้น เป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ในช่วงที่โปรตีนกดดันจะมาจับตัว ซึ่งช่วงนี้จะคาบเกี่ยวเข้าไปในบริเวณส่งเสริม ความรู้นี้จึงเป็นข้อพิสูจน์ข้อเสนอแนะที่ว่าโปรตีนกดดันบดบังไม่ให้เกิดทรานสคริปชั่นด้วย สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งก็คือ การเริ่มต้นสร้างสาย mRNA นั้นเกิดก่อนที่จะถึงจุดเริ่มต้นของยีนโครงสร้างยีนแรก (ยีน Z) นอกจากนี้ยังพบว่าการเรียงลำดับของคู่เบส 21 คู่ ในส่วนที่เป็นบริเวณจับตัวของโปรตีนกดดันในบริเวณดำเนินการนั้นเป็นแบบพาลินโดรม (palindrome)

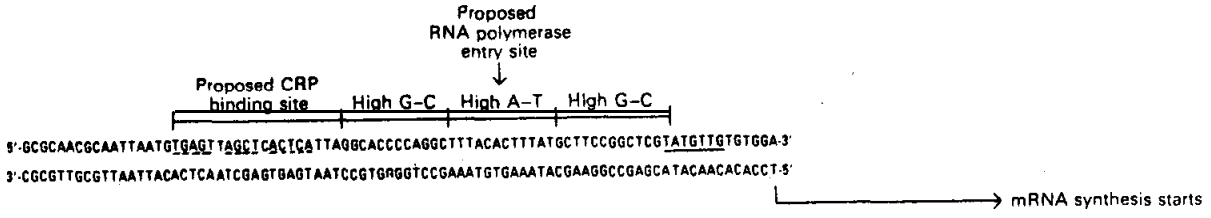


รูปที่ 5–8 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ใน lac operon ของ E. coli

การเรียงตัวของเบสแบบที่เรียกว่าพาลินโดรม จะมีความสมมาตร (symmetry) ระหว่างด้านซ้ายและขวาของแกนกลาง ดังรูป

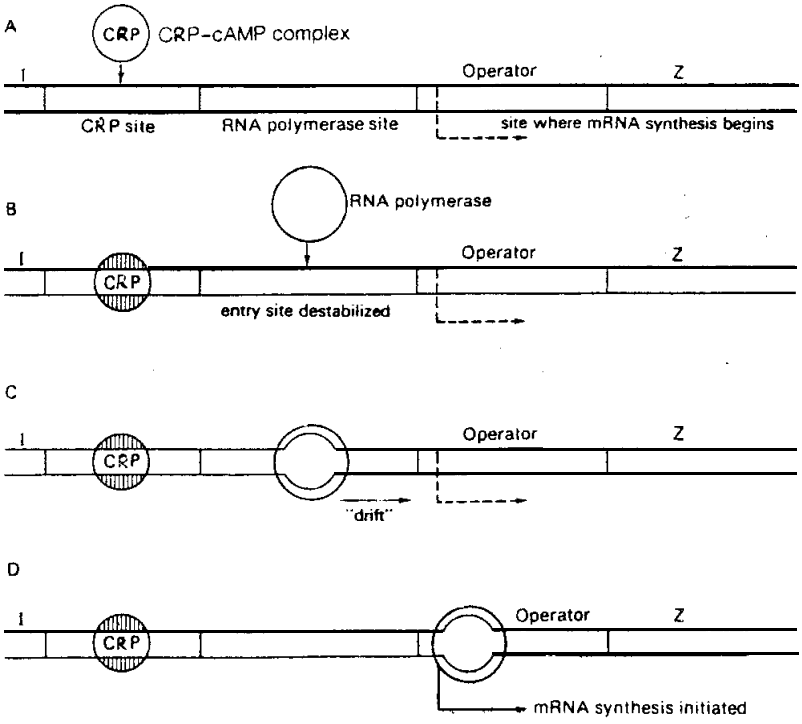
```
5'—G—T—T+A—A—C—3'
3'—C—A—A+T—T—G—5'
5'—A—G+C—T—3'
3'—T—C+G—A—5'
↓
Axis of symmetry
```

สำหรับการเรียงลำดับของคู่เบส 85 คู่ในบริเวณส่งเสริมนั้น (รูปที่ 5-9) พบว่าบริเวณที่ cAMP-CRP คอมเพล็กซ์จับตัวจะเป็นลักษณะพาลินโดรมเช่นกัน ถัดไปก็จะเป็นช่วงที่มี G-C มาก แล้วจึงถึง "entry site" คือที่ที่ RNA โพลีเมอเรสจับตัวซึ่งจะมี A-T สูง ถัดจากนี้ไปก็จะถึงช่วงที่มี G-C มากอีก การที่ RNA โพลีเมอเรสเลือกจับตัวบริเวณที่มี A-T สูงก็เพราะว่าสายคู่ของ DNA บริเวณนี้จะแยกออกจากกันได้ง่ายกว่าและบ่อยกว่าบริเวณที่มี G-C มาก สำหรับเรื่องที่ว่าการจับตัวของ cAMP-CRP คอมเพล็กซ์จะช่วยทำให้ RNA โพลีเมอเรสจับตัวได้ดีขึ้นนั้น ยังไม่ทราบว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร แต่มีผู้เสนอแนะว่าอาจเกิดจากการจับตัวของคอมเพล็กซ์ไปทำให้โครงรูปเกลียวคู่ของ DNA ที่ "entry site" อันมี A-T



รูปที่ 5–9 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่งเสริมของ lac operon ของ E. coli **เส้นไข่ปลาคือส่วนที่เป็นพาลินโดรมของบริเวณที่ CRP จับตัวและที่ขีดเส้นใต้คือ Pribnow box**

อยู่เป็นจำนวนมากนั้น มีเสถียรภาพลดน้อยลง สภาพการณ์นี้จึงเอื้ออำนวยต่อการเข้าจับตัวของ RNA โพลีเมอเรสมากขึ้น (รูปที่ 5-10) เมื่อจับตัวเรียบร้อยแล้ว เชื่อว่าเอนไซม์นี้จะเลื่อนตัว (drift) ไปจนถึงจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่น แล้วเกาะติดอยู่ที่นี่อย่างแน่นหนา เพื่อเกิดการสังเคราะห์ mRNA ต่อไป



รูปที่ 5-10 แผนผังการเริ่มต้นขบวนการทรานสคริปชั่นของ lac operon

การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสเลชั่นของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

การควบคุมในระดับทรานสเลชั่น จะไม่ค่อยมีความสำคัญเท่าที่เกิดในระดับทรานสคริปชั่น เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วคือ จะเป็นการสูญเสียพลังงานและวัสดุไปโดยเปล่าประโยชน์

การควบคุมในระดับนี้อาจทำได้โดย

1. ควบคุมการเริ่มต้นสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์

2. ควบคุมปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่จะถูกสังเคราะห์ขึ้น ในบางโอเปอรอน ผลิตภัณฑ์ของยีนต่าง ๆ คือโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างชนิดกันนั้น ไม่จำเป็นที่จะต้องถูกสร้างขึ้นในจำนวนเท่า ๆ กัน ซึ่งการควบคุมปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านี้ จะทำได้โดยการหลุด (drop) ของไรโบโซมออกจากสาย mRNA ก่อนที่ทรานสเลชั่นจะเสร็จสมบูรณ์ตลอดสายของ mRNA นั้น

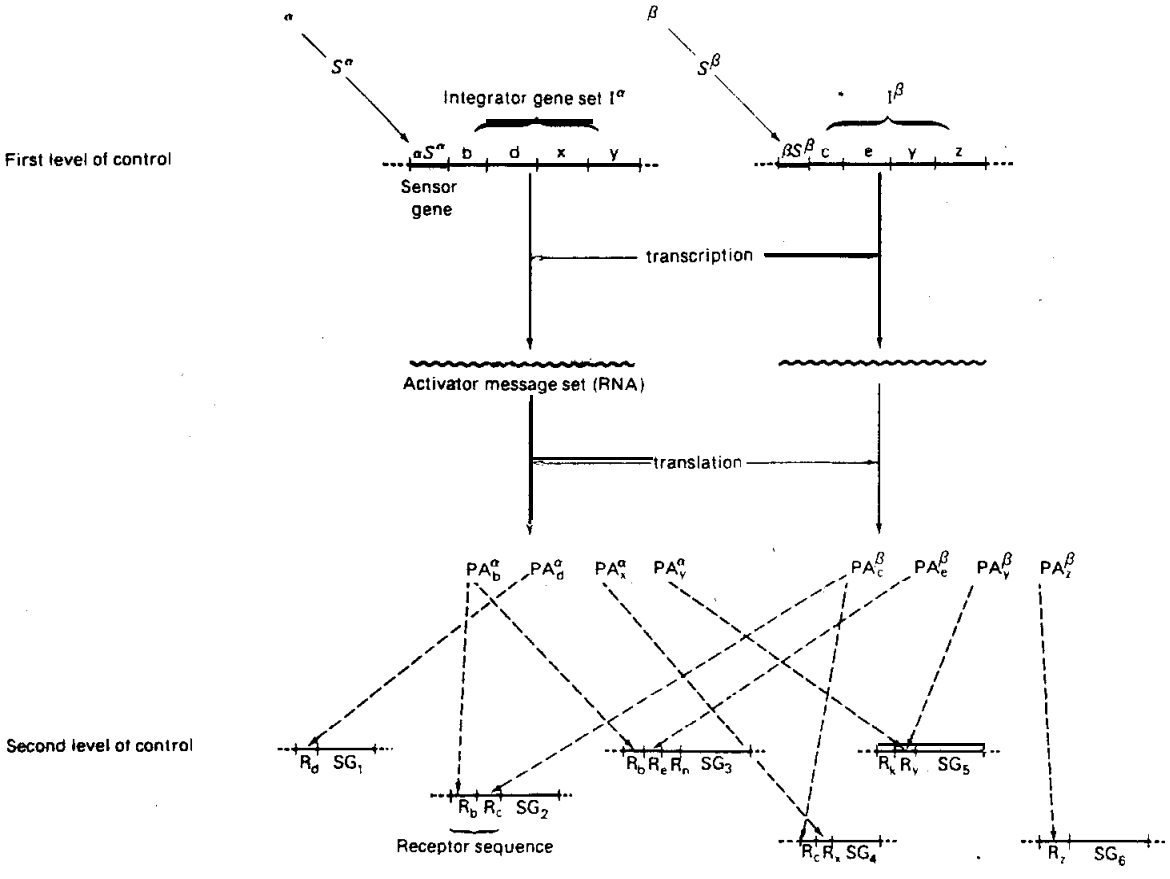
การควบคุมการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

การแสดงออกของยูคาริโอทยีนศึกษาได้ยากกว่าใน E.coli ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของยูคาริโอทมีความยาวและซับซ้อนมากกว่าในโปรคาริโอท คือจะมีโปรตีนพวกฮิสโตนรวมอยู่กับ DNA ด้วย และเมื่อศึกษาดูแล้วจะพบว่ารูปแบบของการควบคุมก็จะแตกต่างไปจากที่พบใน E.coli ตัวอย่างเช่น ในยูคาริโอทคิดว่าอาจไม่มีโอเปอรอน ซึ่งคือกลุ่มของยีนโครงสร้างที่มีความสัมพันธ์กันและมาอยู่ต่อเนื่องกัน เพื่อที่จะถูกควบคุมได้พร้อม ๆ กัน นอกจากนี้ยังพบว่า รูปแบบที่เป็นหลักของการควบคุมในยูคาริโอทจะเป็นแบบโพซิทีฟ โดยที่มักจะมีตัวควบคุมเพียงตัวเดียว ได้แก่สเตียรอยด์ฮอร์โมนเป็นตัวไปกระตุ้นให้ยีนโครงสร้างหลาย ๆ ชนิดทำงานในการสร้างโปรตีนได้

เมื่อมีข้อมูลเกี่ยวกับยูคาริโอทยีนและการควบคุมในระดับโมเลกุลบ้างเช่นนี้ Roy Britten และ Eric Davidson จึงได้สร้างสมมติฐานขึ้นเพื่ออธิบายถึงการแสดงออกของยูคาริโอทยีน ปรากฏว่าสมมติฐานของเขาได้เป็นที่ยอมรับในวงการวิจัยยีนสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่นเดียวกับที่สมมติฐานของ Jacob-Monod เป็นที่ตื่นเต้นแก่วงการวิจัยยีนสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเมื่อ ค.ศ. 1961 แต่เมื่อมีการวิจัยระยะหลัง ๆ ต่อมา สมมติฐาน Britten-Davidson ก็ชักจะเสื่อมถอยลง อย่างไรก็ดีสมมติฐานนี้ก็ยังคงเป็นแนวคิดทางวิทยาศาสตร์ที่บุกเบิกช่องทางอันจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงการควบคุมของยูคาริโอทยีน แม้ว่ายังคงมีรายละเอียดบางประการที่สมมติฐานนี้ให้ความกระจ่างไม่ได้มาก ในปัจจุบันได้มีการวิจัยทางรีคอมบิแนนท์ DNA และการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสบน DNA ซึ่งให้ข้อมูลใหม่ ๆ เกี่ยวกับยูคาริโอทยีนเพิ่มขึ้นอยู่เรื่อย ๆ

Britten-Davidson Model

สมมติฐานนี้ได้รวมเอาการควบคุมแบบโพซิทีฟ 2 ระบบเข้าด้วยกัน และต้องใช้โปรตีนควบคุม 2 ประเภท (รูปที่ 5-11) โดยที่ในระดับแรกของการควบคุมเกิดขึ้นเมื่อ effector (α) ซึ่งได้แก่ฮอร์โมน เข้าจับตัวกับโปรตีนควบคุมประเภทแรก คือ sensor protein (S^{α}) ซึ่งได้แก่รีเซปเทอร์โปรตีนที่อยู่ในไซโตปลาสม จากนั้นคอมเพล็กซ์ที่ได้จะไปกระตุ้น sensor gene



รูปที่ 5-11 แผนผัง Britten-Davidson model ที่ใช้อธิบายการควบคุมของยูคาริโอทยีน

ตัวย่อที่ใช้ในรูป : α และ β คือ effectors

S^{α} และ S^{β} คือ sensor proteins

PA คือ activator protein

SG คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene)

ซึ่งควบคุมขบวนการทรานสคริปชั่นของกลุ่ม integrator genes (I^{α}) ที่อยู่บน DNA สายเดียวกับ sensor gene นั้น ทำให้เกิดการสร้างสาย RNA ชนิด polycistronic ขึ้นได้ สาย RNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ต่อไปในการสร้างโปรตีนควบคุมประเภทที่สอง คือ activator proteins จากนี้จะเข้าสู่ระดับที่สองของการควบคุม คือ activator protein จะเข้าทำปฏิกริยากับส่วนของ DNA ที่เรียกว่า receptor sequence ที่เฉพาะเจาะจง แล้วทำให้ยีนโครงสร้างทำงานได้ คือ เกิดการสร้างสาย RNA และโปรตีนขึ้น สำหรับการเรียกชื่อ activator protein (PA) ทำได้โดยใช้สัญญลักษณ์ 2 ตัว ตัวหนึ่งอยู่ทางบนขวา บอกถึงที่มาของโปรตีนนี้ว่าเกิดขึ้นมาจาก integrator gene กลุ่มไหน อีกตัวหนึ่งอยู่ทางล่างขวา ตัวนี้บอกว่า activator protein จะจับตัวกับ receptor sequence อันไหน ตัวอย่างเช่น PA_b^{α} ก็คือ activator protein ที่เกิดมาจาก integrator genes กลุ่ม I^{α} และจะจับตัวกับ receptor sequence R_b ซึ่งควบคุมการทำงานของยีนโครงสร้าง SG_2 และ SG_3 ถ้าจะสรุปจากรูป 5-11 เป็นข้อ ๆ แล้ว จะได้ดังนี้

1. effector แต่ละตัวจะรับผิดชอบเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนโครงสร้างมากกว่า 1 ตัว กล่าวคือ effector α ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง SG_1 ถึง SG_5 ในขณะที่ effector β ควบคุมการแสดงออกของ SG_2 ถึง SG_6

2. ยีนโครงสร้าง (SG_2 ถึง SG_5) อาจมีมากกว่า 1 receptor sequence เรียงกันอยู่ข้างหน้า ทำให้ยีนโครงสร้างตัวนั้นสามารถที่จะถูกกระตุ้นได้จาก effector หลายตัว

3. activator proteins ที่เกิดขึ้นมาจากทรานสคริปชั่นของ integrator gene กลุ่มที่ต่างกัน (PA_Y^{α} และ PA_Y^{β}) สามารถที่จะจับตัวกับ receptor sequence อันเดียวกันได้ (R_Y)

4. receptor sequence แต่ละอัน สามารถรวมตัวได้กับยีนโครงสร้างมากกว่า 1 ชนิด ตัวอย่างเช่น R_b จะรวมตัวได้กับ SG_2 และ SG_3

จากที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่า Britten-Davidson model เป็นรูปแบบของการควบคุมยีนโครงสร้างอย่างกว้าง ๆ ที่อธิบายถึงการที่ effector เพียงตัวเดียวสามารถทำให้เกิดผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นลำดับขั้นตอนต่อ ๆ กันมาได้ (cascading effect)